



N- α -BENZOYL - ARGININ - 9- NAPHTHYLAMID - HYDROCHLORID
ALS NEUES SUBSTRAT ZUR COLORIMETHISCHEN
MIKROBESTIMMUNG VON TRYPSIN

mit einem Anhang

ÜBER DIE SYNTHESE VON α -L-GLUTANYL-L-ASPARAGINSÄURE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu
München

Berichterstatter: 1. Prof. W. Grassmann
2. Prof. R. Huisgen

Für die mündliche Prüfung:

vorgelegt im Oktober 1956

VON

ALFONS HARTL
aus Pfronten



N- α -BENZOYL - ARGININ - D - NAPHTHYLAMID - HYDROCHLORID

ALS NEUER ZURSATZ ZUR COLORIMETRISCHEN

MIKROBESTIMMUNG VON TRYPSIN

Mit einem Anhang

ÜBER DIE SYNTHESE VON α -L-GLUTAMYL-L-ASPARAGINSÄURE

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu

München

Berichterstatter: 1. Prof. W. Grassmann

2. Prof. R. Huisgen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.1.1959

vorgelegt im Oktober 1958

von

ALFONS HARTL

aus Erlenbach

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Abschnitt 1

N- α -Benzoyl-L-arginin- β -naphthylamid-hydrochlorid als
neues Substrat zur colorimetrischen Mikrobestimmung
von Trypsin

	Seite
I Einleitung	3
II Theoretischer Teil	4
A) Enzymatische Voraussetzungen für die Syn- these eines spezifischen Trypsinsubstrates	4
B) Theoretische Grundlagen für die Darstellung von Benzoyl-arginin- β -naphthylamid-HCl	13
III Experimenteller Teil	21
1.) Substratsynthese nach der Carbodiimidmethode	
a) Aus Benzoylarginin-HCl und Naphthylamin	21
b) Aus Benzoyl-nitroarginin und Naphthyl- amin	22
2.) Syntheseversuch nach der Isocyanatmethode	24
3.) Versuchsbeschreibung	27
N- α -Benzoyl-DL-arginin- β -naphthylamid-HCl	
a) aus Benzoyl-arginin-HCl und β -naphthyl- amid (Methode a)	27
b) aus Benzoyl-nitroarginin und β -naphthyl- amin (Methode b)	28
c) Überprüfung der optischen Aktivität des Arginins	30
d) Versuch zur Darstellung von N- α -Carbo- benzoxy-nitroarginin- β -Naphthylamid nach der Isocyanatmethode	31

	Seite
IV Enzymversuche	34
1.) Material und Methoden	35
a) Lösungen	35
b) Filterwahl und Farbbeständigkeit	37
c) Eichkurve für Naphthylamin	40
2.) Abbauversuche	42
a) quantitativer Abbau von N- α -Benzoyl- arginin- β -naphthylamid-HCl	42
b) Testkurve für die quantitative colori- metrische Bestimmung von Trypsin	48
c) Spezifität des Substrates	52
V Zusammenfassung über Abschnitt 1	53

Abschnitt 2 - Anhang

Über die Synthese von α -L-Glutamyl-L-Asparaginsäure	55
I Einleitung	56
II Theorie und eigene Ergebnisse	57
III Beschreibung der Versuche	64
1.) N-Carbobenzoxym-L-Glutaminsäure	64
2.) N-Carbobenzoxym-L-Glutaminsäureanhydrid	64
3.) N-Cbzo-L-Glutaminsäure- α -Phenylthioester	64
4.) N-Cbzo- α -L-Glutamyl-L-Asparaginsäure	65
5.) α -L-Glutamyl-L-Asparaginsäure	67
IV Zusammenfassung über Abschnitt 2	68
X Literaturverzeichnis	69

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Z U S A M M E N F A S S U N G Ü B E R

A B S C H N I T T 1

Bisher stand für die Aktivitätsbestimmung von Trypsin keine genaue, spezifische und allgemein anwendbare Methode zur Verfügung. Es war der Sinn vorliegender Arbeit, eine solche Methode auszuarbeiten.

1. Voraussetzung für eine spezifische Aktivitätsbestimmungsmethode ist ein Substrat, das nur von Trypsin gespalten wird. Ein für Trypsin geeignetes, spezifisches Substrat muss folgende Bedingungen erfüllen: Eine basische Aminosäure muss mit ihrer Carboxylgruppe über eine Amidbindung mit einer chromophoren Gruppe derart verknüpft sein, dass diese bei der enzymatischen Spaltung für die colorimetrische Auswertung frei wird. Die Aminogruppe der basischen Aminosäure muss an einer weiteren Peptid- bzw. Amidbindung beteiligt sein. Die basische Gruppe in ω -Stellung muss ungeschützt vorliegen.

2. N- α -Benzoylarginin- β -naphthylamid-HCl wurde deshalb als geeignete Verbindung ausgewählt und nach der Carbo-diimidmethode synthetisiert. Benzylarginin-HCl wurde in Dimethylformamidlösung mit der äquivalenten Menge, sowie mit 5 Äquiv. β -Naphthylamin umgesetzt. In einer zweiten Versuchsserie wurde in analoger Weise Benzylnitroarginin zur Synthese verwendet und anschliessend die NO_2 -Schutzgruppe hydrogenolytisch entfernt. Trotz Ausdehnung der Reaktionszeit auf 14 Std. konnte die Ausbeute nicht über 32 - 34 % gesteigert werden.

3. Durch enzymatische Abbauversuche sowie durch Überprüfung des durch Hydrolyse aus dem Substrat zurückgewonnenen Arginins konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Umsetzung sowohl von Benzoyl-arginin als auch von Benzoyl-

nitroarginin mit β -Naphthylamin nach der Carbodiimidmethode zu einem Produkt führt, das vollständig razemisiert ist. Eine vollständige Razemisierung ist bei dieser Methode bisher noch nie beobachtet worden.

4. Die für die Razemisierung verantwortliche Abweichung vom normalen Reaktionsverlauf könnte darin bestehen, dass die Reaktion über eine Oxazolonzwischenstufe abläuft. Die Reaktionsfreudigkeit von β -Naphthylamin ist offensichtlich so gering, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der nukleophilen Additionsreaktion nicht ausreicht, um den normalen Reaktionsweg zu erzwingen. Das nach der Anlagerung von Carbodiimiderhaltene Zwischenprodukt stabilisiert sich durch innermolekulare Protonenverschiebung zum Oxazolon und disubstituierten Harnstoff. Bei der Öffnung des Oxazolons zur Naphthylamidverbindung entstehen naturgemäss Derivate des DL-Arginins, da sich die mesomeren Grenzformen einer aromatischen Struktur ausbilden können. In der Tat wurde bei der Synthese von Benzoylnitroarginin- β -naphthylamid ein Nebenprodukt isoliert, dessen Analysendaten dem eines um 1 Mol Wasser ärmeren Benzoylnitro-arginin, wie es für ein Oxazolonderivat zutrifft, entsprechen.

5. Beim Versuch, die N-Carbonylverbindung des β -Naphthylamins zur Synthese von Cbz-nitroarginin- β -naphthylamid nach der Isozanatmethode heranzuziehen, wurde in fast vollständiger Ausbeute N-N'-Dinaphthylharnstoff erhalten. Offensichtlich fand als Konkurrenzreaktion zur Säureamidbildung eine Disproportionierung des gemischten Anhydrid-Zwischenproduktes zu einem disubstituierten Harnstoff und einem Kohlensäurebis-anhydrid statt, das spontan unter CO_2 -Abspaltung in das symmetrische Anhydrid der Ausgangssäure übergeht.

6. Das synthetisierte N- α -Benzoyl-DL-arginin- β -naphthylamid-HCl wurde zunächst einem Endabbau durch Trypsin verschiedener Konzentration - zum Teil mit erheblichem Enzymüberschuss - unterworfen. Bei einer konstanten Substratkonzen-

tration von 220 μ /5 ml Reaktionsmischung betrug die Trypsinmenge 25, 50, 100, 200, 400 und 1200 . Alle Abbaukurven, auch bei den sehr hohen Enzymkonzentrationen, laufen auf einen Endwert hinaus, der genau einer 50 %igen Spaltung des Substrats entspricht. Alles vorhandene L-Substrat wird von Trypsin in relativ kurzer Zeit quantitativ abgebaut, während die D-Form nicht hydrolysiert wird.

7. Zur Überprüfung einer enzymhemmenden Wirkung von β -naphthylamin wurden Versuche durchgeführt, in denen von Anfang an Naphthylamin zugesetzt war. Sie ergaben zwar eine eindeutige Verlangsamung der Hydrolysegeschwindigkeit, die jedoch ohne Einfluss auf die Vollständigkeit der Spaltung ist.

8. Mit Hilfe dieses Substrats wurde eine quantitative colorimetrische Bestimmungsmethode für Trypsin ausgearbeitet. Unter Verwendung von kristallisiertem Trypsin wurde eine Aktivitätskurve ermittelt, die es gestattet, aus einem Enzymgemisch unbekannter Zusammensetzung die vorhandene Trypsinaktivität festzustellen und mit Hilfe der auf 1 μ abgespaltenes Naphthylamin festgelegten Einheit die spezifische Aktivität zu ermitteln. Als Trypsineinheit wurde diejenige Menge Enzym definiert, die aus 2,5 mg N- α -Benzoylarginin- β -naphthylamid-HCl = 1,25 mg L-Substrat, gelöst in 5 ccm Pufferlösung von pH 7,8, in einer halben Stunde 1 μ β -Naphthylamin in Freiheit setzt.

9. Unter den Bedingungen der Methode zeigten folgende untersuchte Enzyme keine Einwirkung auf das Substrat: Kristallisiertes Chymotrypsin, krist. Pepsin, krist. Carboxypeptidase, Amino-peptidase, hochgereinigtes Präparat aus Hefe und Esterase (hochgereinigtes Präparat aus Hefe-
deleber).

ZUSAMMENFASSUNG ÜBER

ABSCHNITT 2

In vorliegender Arbeit sollte versucht werden, L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure auf einem eindeutig verlaufenen Reaktionsweg zu koppeln. Die Synthese sollte ausserdem ohne Verwendung von Ester-Schutzgruppen durchgeführt werden, um eine alkalische Verseifung der w-Estergruppen zu vermeiden. Diese ist quantitativ nur mit überschüssiger Lauge zu erreichen, was wegen der Alkaliempfindlichkeit des Carbobenzoxysterests wenig vorteilhaft erscheint. Die Synthese wurde über den α -Phenylthioester der Glutaminsäure auf folgendem Weg durchgeführt:

1. N-Cbzo-L-Glutaminsäure -anhydrid wurde aus Cbzo-L-Glutaminsäure durch Behandeln mit Acetanhydrid in 90 %iger Ausbeute gewonnen.
2. Die Aufspaltung des Anhydrids mit Thiophenol erfolgte in Tetrahydrofuranlösung in Gegenwart von 2 Äquiv. Pyridin bei Raumtemperatur. Die Umsetzung in schwach polaren Lösungsmitteln liefert hauptsächlich α -Thioester neben wenig γ -Verbindung. Die Isolierung und Reindarstellung des Cbzo-L-Glutaminsäure α -Phenylthioesters gelang durch langsame Kristallisation aus Äther/Petroläther, da der α -Ester gegenüber der γ -Verbindung relativ schwer löslich ist.
3. Der reine α -Thioester wurde in Tetrahydrofuran-Methanol-Wasser-Lösung mit dem Di-Na-Salz von Asparaginsäure bei 60° umgesetzt. Dabei wurde ein Produkt erhalten, das noch Cbzo-Glutaminsäure enthielt. Auf Grund des Aciditätsunterschiedes konnte die Verunreinigung durch mehrfache fraktionierte Verteilung zwischen Essigester und KHCO_3 -Lösung abgetrennt werden.

4. Die chromatographisch und analytisch reine N-Carbobenzoxy- α -L-Glutamyl-L-Asparaginsäure wurde durch hydrogenolytische Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe in das freie Dipeptid überführt. Die so erhaltene α -L-Glutamyl-L-asparaginsäure war chromatographisch und analytisch einheitlich.

Lebenslauf.

Ich - Alfons Hartl - wurde am 17. Juni 1927 in Pfrentsch/
Landkr.Vohenstrauss als Sohn des Lehrers Hermann Hartl
und seiner Ehefrau Klara geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule an verschiedenen Orten
trat ich 1938 in die Oberschule für Jungen in Amberg
über. 1943 wurde ich als Flakhelfer und im Herbst 1944,
nach kurzer RAD-Zeit, zur Wehrmacht eingezogen. 1945 Ein-
satz an der Ostfront und 8 Monate Kriegsgefangenschaft.
Ab 1946 besuchte ich wieder die alte Schule bis zum Abi-
tur 1947.

1948 konnte ich das Studium der Chemie an der erweiterten
Hochschule in Regensburg aufnehmen, legte dort 1951 das
Vorexamen und im Juli 1953 an der Universität München
das Diplom-Chemiker-Hauptexamen ab.

Im Herbst 1953 konnte ich am Max-Planck-Institut für
Eiweiss- und Lederforschung in Regensburg unter Anlei-
tung von Herrn Professor Grassmann mit der Diplomarbeit
beginnen. Am gleichen Institut konnte ich in der Zeit
von Januar 1956 bis April 1958 zunächst in Regensburg
und später in München meine Dissertation durchführen.

